

厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

化学物質の有害性評価手法の迅速化、高度化に関する研究
- 新型反復暴露実験と単回暴露実験の網羅的定量的遺伝子発現情報の
対比による毒性予測の精緻化と実用版毒性予測評価システムの構築 -
(H27-化学-指定-001)

化学物質の反復暴露によるノンコーディング RNA の発現解析
及び

Perce llome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進

分担研究者 相崎 健一

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 第一室 室長

研究要旨

本研究は、先行実施された Perce llome¹ トキシコゲノミクス研究を基盤に、分子メカニズムに依拠した網羅的毒性評価手法を構築し、毒性予測と評価の一層の迅速化、高精度化を進めることを目的とする。

特に先行 3 年間に実施した「新型」反復暴露実験²により、化学物質の反復投与による生体影響が分子レベルにおいて数日で定常化する所見を複数見出した。これを利用すれば、現在は長い時間と多額の費用を要している長期反復暴露の毒性評価を大幅に効率化できる可能性が高い。

本分担研究では平成 27 年度と同様、引き続き (a) 化学物質の反復暴露におけるノンコーディング RNA(ncRNA)の発現変動解析、及び (b) Perce llome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進、を行った。

今年度、(a) では、ncRNA のうち、長鎖 ncRNA など、成熟マイクロ RNA³以外の転写産物について total RNA-Seq による解析を進めた。平成 27 年度に測定済みの四塩化炭素[14+1]²の解析に加え、平成 28 年度は、四塩化炭素[4+1]やバルプロ酸ナトリウム塩[14+1]及び[4+1]、クロフィブレート[14+1]、アセトアミノフェン[4+1]について、total RNA-Seq を行い、発現変動解析を進め、有意な変動のあった転写産物、特に ncRNA を抽出した。

(b) では、公開サイトの RESTful サーバーアプリケーションソフトウェアのセキュリティ強化を進めた。

(*1) mRNA発現値を細胞 1 個当たりのコピー数として絶対定量する方法。

(*2) 全動物に同量の検体を反復投与し、遺伝子発現測定直前の投与時に、溶媒群、低用量群、中用量群、高用量群に分けて最終投与を一回行う。表記については単回投与の場合を[0+1]、14日間反復投与し最終投与1回を行う場合を[4+1]と記す。先行3年間の研究により、反復暴露による生体影響は分子レベルでは、暴露の都度の変化を示す成分である「過渡反応」と、回を重ねるに連れ発現値の基線を徐々に移動させる成分である「基線反応」に分けて解釈できることが判明している。

(*3) 成熟マイクロRNAについては短鎖であるため他とは別に抽出する必要があるため平成29年度に先送りとした。

A . 研究目的

本研究は、化学物質が生体に及ぼす毒性影響の評価手法を、生体反応の分子メカニズムに基づいて迅速化、高精度化、省動物化し、インフォマティクス技術と統合して実用化する事を目的とする。

特に本分担研究では、ノンコーディング RNA の発現変動解析を以て、化学物質の反復暴露による基線反応の分子機序の解明を目的とする。また併行して、既存の Perce llome 専用解析ソフトウェアのオンライン化を進めて研究成果の速やかな社会還元を目指す。

B . 研究方法

(a) 化学物質の反復暴露によるノンコーディング RNA の発現解析

平成 27 年度に実施した最適化プロトコルにより、平成 28 年度は先ず成熟型マイクロ RNA 以外*の転写産物について次世代シーケンサーによる網羅的解析を進めた(*ノンコーディング RNA の一種であるマイクロ RNA は成熟すると 20bp 前後の短鎖となるため、通常のメッセンジャー RNA (mRNA) や長鎖ノンコーディング RNA (lincRNA) と同時に定量性を保ったまま精製出来ないため)。

使用したマウス肝サンプルは、5mm 径の生検トレパンにより切り抜いた組織片をチューブに採取し、採取後すみやかに RNA later (Ambion 社) を加えて 4 で一晩浸漬して、RNase を不活化、その後、-80 にて保存していたものである。抽出に当たっては、RNA later を除いた後、RNeasy Kit (Qiagen) のホモジナイズバッファを添加し、ジルコニアビーズ及び MM300 (Retsch) を用いて破砕液を調製した。得られた破砕液の 10 μ L を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定し、DNA 含量に応じ、臓器毎にあらかじめ設定した割合で Graded-dose Spike cocktail (Bacillus 由来 RNA 5 種類の濃度を公比 3 で混合した溶液) を適量添加し、TRIZOL により水層を得、RN easy キットにより全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無などの品質を確認した。

RNA-Seq には Illumina 社の次世代シーケンサー NextSeq500 を用いた。シーケンスするライブラリは同社の TruSeq Stranded Total RNA Library Preparation Kit を用いて、全 RNA から調整した。NextSeq500 によるシーケンス処理はメーカーの標準手順に従って実行した。

次世代シーケンサーデータの数値化等、データ処理には、Perce llome 手法に対応させたカスタムゲノム

を用意した上で、RNA-Seq 解析ソフトウェアの主流となっている Tophat , Cufflinks を利用した。Cufflinks から出力された FPKM データは、マイクロアレイと同様に、SCal4.exe を用いて絶対量化した。データ解析にはマイクロアレイと同様に独自開発のソフトウェア群 (MFtools) を使用し、アノテーション付与には Ensembl BioMart を利用した。

倫理面への配慮

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する指針のある場合は、その指針を遵守している。(国立医薬品食品衛生研究所は国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定になる国立医薬品食品衛生研究所・動物実験等の適正な実施に関する規程 (平成 27 年 4 月版))

C . 研究結果

(a) 化学物質の反復暴露によるノンコーディング RNA の発現解析

ノンコーディング RNA とはタンパク質をコードしない RNA の総称であり、メッセンジャー RNA (mRNA) と同等の長さを有するものから、成熟すると約 20bp の短鎖となるマイクロ RNA まで、様々な長さの RNA 分子を含む概念である。平成 27 年度のプロトコル検討により、生体サンプルからの RNA を精製する場合、RNA 鎖長により効率が異なり、定量性を保ったまま、短鎖の成熟型マイクロ RNA とそれ以外 (mRNA や長鎖ノンコーディング RNA 、マイクロ RNA 前駆体など) を同時に抽出する事は困難であることが判明している。

そこで平成 28 年度はより多くの情報を取得することを優先し、スプライシングバリエーション情報も含むメッセンジャー RNA と長鎖ノンコーディング RNA など、成熟型マイクロ RNA 以外の転写産物の測定、解析を進め、四塩化炭素 ([14+1] 及び [4+1])、バルブプロ酸ナトリウム塩 ([14+1] 及び [4+1])、クロフィブレート ([14+1])、アセトアミノフェン ([4+1]) について、次世代シーケンサー NextSeq500 による測定を実施した。

シーケンスデータは bcl2fastq で FASTQ ファイルに変換した後、Tophat2 で GSC 配列を追加したマウスゲノム (mm10) にマッピングし、Cufflinks にて FPKM 計算を行った。さらに破砕液の段階で DNA 含量に対応した量を添加した外部スパイク (GSC) の FPKM から疑似検量線を生成し絶対量化計算を行う一連の処理を、SCal4.exe を用いて実行した。

本研究では、反復暴露における基線反応の分子機序解

析を行うため、新型反復暴露プロトコルに従って化学物質を強制経口投与したマウスの肝臓サンプルのうち最終投与後 2 時間の溶媒群と、同じ溶媒を用いて単回投与実験を行ったマウスの肝臓サンプルのうち投与後 2 時間の溶媒群とを比較した。比較解析では、t 検定で有意($p < 0.05$)となり、変動率が 1.5 倍若しくは 0.67 倍となる転写産物を抽出した(表 1)。

		total	lincRNA	miRNA	snRNA	snoRNA	
CCI4	14+1	Up	591	26	0	7	0
		Down	230	6	0	0	0
	4+1	Up	48	3		1	1
		Down	1056	29	1	8	2
VPA	14+1	Up	65	2	0	1	0
		Down	330	5	3	3	5
	4+1	Up	24	2	0	0	4
		Down	2260	50	3	2	2
Clofibrate	14+1	Up	239	13	0	1	3
		Down	443	19	0	7	0
Acetaminophen	4+1	Up	37	2	0	2	6
		Down	2817	62	1	2	1

表 1. 各化学物質の反復暴露によって基線反応に変動を呈した転写産物の件数

また、Linux のコマンドライン操作に精通していない Wet 研究者でもデータ処理を簡便に行えるよう、ローカルサーバーに構築したグラフィカルユーザーインターフェイス (GUI) ベースの Web 統合プラットフォーム Galaxy 上で、マッピングに用いるカスタムゲノムやアノテーション情報の最適化を進め、転写産物毎の数値化の各プロセスを包含・自動化した解析パイプラインの改良を進めた。

(b) Percellome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進

オンライン化された Percellome 専用解析ソフトウェアのうち、Percellome データベースを参照するソフトウェアは、Percellome 公開サイトに REST 形式でアクセスし、JSON フォーマットのデータを取得する。Percellome 公開サイトにおいて、この仕組みを担っている RESTful サーバーアプリケーションソフトウェアにおいて、潜在的なセキュリティリスクが発見されたため、この対処を進めた。

D . 考察

反復暴露影響の分子機序解析による、既存の単回暴露実験データベースからの反復毒性予測の性能評価においては、先行研究において、肝(及び一部、肺)における四塩化炭素、バルプロ酸ナトリウム、クロフィブレートの新反復暴露実験により、単回暴露時に発現変動した遺伝子の多くについて、基線反応

成分(暴露回数を重ねるに連れて発現値のベースライン(基線)が徐々に変動する反応成分)と過渡反応成分(単回暴露時の 2, 4, 8, 24 時間のうちに発現が変動する速い変化の成分)との関連性が見いだされた。反復投与により発現量が増加する事例があることから、反復投与による代謝誘導による化学物質の分解促進では説明できない事象であると考えられ、むしろ、エピジェネティクス分子機序の関与が示唆されたことから、これを確認すべく、北嶋聡分担研究者が化学物質の反復投与による DNA メチル化変動等を網羅的に解析しているに合わせ、本分担研究では、エピジェネティクスとの関連性が明らかになりつつあるノンコーディング RNA の発現変動解析を進めた。

平成 28 年度の研究の結果、長鎖 ncRNA (lincRNA) を中心として複数の転写産物を抽出したが、それらの大半は詳細が知られていないものが多く、反復暴露影響の成立機序への関与は不明であったため、引き続き情報収集を行う事とした。

Percellome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進については、基盤となる公開サイトのセキュリティ強化を進めたことで、利用者の利便性/安全性を向上させつつある。

E . 結論

本分担研究は、ほぼ計画通りに進捗した。

「化学物質の反復暴露におけるノンコーディング RNA の発現解析」については、平成 28 年度までに四塩化炭素、バルプロ酸ナトリウム塩、クロフィブレート、アセトアミノフェンによる新反復暴露の RNA-Seq を終え、成熟型マイクロ RNA 以外の転写産物についての発現データを得た。平成 29 年度は取得済みのデータの詳細な解析を進めつつ、成熟型マイクロ RNA の測定を行う。

「Percellome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進」において、平成 28 年度は基盤となる公開システムのセキュリティ強化を進め、安定運用を維持した。

F . 研究発表

1 . 論文発表(抜粋)

Furukawa Y, Tanemura K, Igarashi K, Ideta-Otsuka M, Aisaki K, Kitajima S, Kitagawa M, Kanno J., Learning and Memory Deficits in Male Adult Mice Treated with a Benzodiazepine Sleep-Inducing Drug during the Juvenile Period., Front Neurosci. 2016

Jul 20;10:339.

2. 学会発表 (抜粋)

Satoshi KITAJIMA, Ken-ichi AISAKI, Jun KANNO, Lung Percellome Project: Profile analysis of Sick-Building-Syndrome level inhalation and oral exposure data for prediction of lung toxicity, 第 43 回日本毒性学会学術年会(2016.6.29) 名古屋、日米毒性学会の交流促進プログラム、口演

菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡、Percellome Project の進捗 - 単回および新型反復暴露の比較による予測性向上 -、第 43 回日本毒性学会学術年会(2016.7.1) 名古屋、シンポジウム、口演

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-Ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics of Newly Designed Repeated Dose Study., The 52nd Congress of EUROTOX (第 52 回欧州毒性学会、EUROTOX2016) (2016.9.6)、Seville, Spain, poster

Kitajima S, Aisaki KI, Kanno J, Percellome project on Sick-Building-Syndrome level inhalation for the prediction of lung and brain involvement., 第 14 回国際毒性学会 (ICT2016) (2016.10.3), Merida, Mexico, Round table, Oral

G . 知的所有権の取得状況

1 . 特許取得

なし

2 . 実用新案登録

なし

3 . その他

なし